

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BESTIMMUNG DER GLDH-AKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN SERUM

WILFRIED SPARRER

1978

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. P. Schölmerich)

METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR BESTIMMUNG DER GLDH-AKTIVITÄT
IM MENSCHLICHEN SERUM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

WILFRIED SPARRER

aus Niederlustadt

Mainz 1978

Fachbereichsdekan:

Professor Dr. E. Straub

1. Gutachter:

Professor Dr. W. Prellwitz

2. Gutachter:

Professor Dr. P. Schölmerich

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 1978



Gesamtherstellung



DITTERS BÜRODIENST

6501 HEIDESHEIM/RHEIN

AM KAPELLCHEN 1 · RUF 0 6132 / 57 11

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I.	EINLEITUNG	1
II.	THEORETISCHER TEIL	2
1.	Die Bedeutung der Willens- und Empfindungs- funktionen	3
2.	Das Verhalten des Willens in Tier- und Pflanzenreich	4
3.	Die chemische und physiologische Struktur des Willens	10
4.	Die Abhängigkeit der emotionalen Aktivität von lokalen und globalen Faktoren	12
III.	METHODEN	20
1.	Einleitung	20
2.	Die verschiedenen Testverfahren	20
3.	Veranschaulichung von Schätzungen und Hilfs- angaben in den verschiedenen Tests	24
4.	Die verschiedenen Geräte	25
5.	Anleitung zur Durchführung der Test- verfahren	26
6.	Die Normalwerte	31
IV.	ERGEBNISSE	32
1.	Das Verhalten des Willens-Aktivität in Bezug auf Lage	33
2.	Neurophysiologische Messungen	35
3.	Die kognitiven Funktionen	37
4.	Der Methodenvergleich	37
V.	DISCUSSION	38
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	39
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	39

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. THEORETISCHER TEIL	3
1. Die Bedeutung der Glutamat-Dehydrogenase	3
2. Das Vorkommen der GldH im Tier- und Pflanzenreich	6
3. Die chemische und immunologische Struktur der GldH	10
4. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von lokalen und biochemischen Einflüssen	13
III. METHODEN	20
1. Allgemeine Enzymkinetik	20
2. Die verglichenen Testverfahren	20
3. Konzentrationen von Substraten und Hilfsenzymen in den verschiedenen Testen	24
4. Die verwendeten Geräte	25
5. Anleitungen zur Durchführung der Testverfahren	26
6. Die Normalwerte	31
IV. ERGEBNISSE	32
1. Das Verhalten der GldH-Aktivität in Seren bei Lagerung	32
2. Kontrollmessungen	32
3. Die unspezifische Vorreaktion	35
4. Der Methodenvergleich	37
V. DISKUSSION	50
VI. ZUSAMMENFASSUNG	58
VII. LITERATURVERZEICHNIS	59

I. E I N L E I T U N G

Die Glutamat-Dehydrogenase E.C.1.4.1.3. (G1DH) gewinnt aufgrund ihrer bevorzugten Lokalisation in der Leber neben den Transaminasen immer mehr Bedeutung bei der Diagnostik der Lebererkrankungen.

Der Aussagewert ist jedoch nur im Rahmen weiterer diagnostischer Erhebungen aufrecht zu erhalten.

Ob eine isolierte Erhöhung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum eine diagnostische Bedeutung für Lebererkrankungen hat, bleibt fraglich, da in einer Studie von KOSSMANN (31) erhöhte Glutamat-Dehydrogenase-Aktivitäten bei normalen Transaminasen-Aktivitäten und klinisch unauffälligen Patienten nachgewiesen wurden.

Gründe dafür können sein:

Eine unspezifische eventuell "physiologische" Erhöhung der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität, unscharfe Normalwertgrenzen, statistische Fehlinterpretationen und unpräzise Meßverfahren bzw. Messungen.

Da die Aktivität des Enzyms im menschlichen Serum normalerweise sehr gering ist, muß zu deren Erfassung mit der nicht optimierten Methode die Extinktionsänderung der Reaktionslösung sehr lange beobachtet werden.

Neuere optimierte Testverfahren weisen diesen zeitlichen und die damit verknüpften meßtechnischen Nachteile nicht auf.

In dieser Arbeit werden Vergleiche einer nicht optimierten und einer optimierten Methode und den optimierten Methoden untereinander dargestellt, um über die Reproduzierbarkeit von Enzymaktivitäten aus

derselben Probe - jedoch mit verschiedenen Verfahren bestimmt - eine Aussage machen zu können.

Um die klinische Bedeutung und die Funktion der G1DH richtig beurteilen und die Unterschiede der mit verschiedenen Verfahren gemessenen Enzymaktivitäten besser verstehen zu können, werden im theoretischen Teil die molekulare, immunologische und funktionelle Struktur, die Lokalisation und die Reaktion des Enzyms auf exogene und endogene chemische und physikalische Einflüsse erörtert.

II. THEORETISCHER TEIL

1. Die Bedeutung der Glutamat-Dehydrogenase

Die Glutamat-Dehydrogenase (GldH) ist ein Hauptkettenenzym des Intermediärstoffwechsels.

Trotz der Tatsache, daß ungeachtet hoher GldH-Aktivitäten in isolierten Rattenlebermitochondrien die Oxydation der Glutaminsäure hauptsächlich an Transaminierungsvorgänge und nicht an oxidative Desaminierungsschritte gebunden ist, spielt die GldH durch die von ihr katalysierte Desaminierung eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel (22).

Die Angriffspunkte der GldH im Intermediärstoffwechsel und ihre Beziehung zum Harnstoffzyklus sind in Abb. 1 Seite 3 schematisiert dargestellt.

Durch Transaminierung wird die Aminogruppe der meisten Aminosäuren auf α -Ketoglutarat übertragen, und das entstandene Glutamat wird durch die Dehydrogenase in α -Ketoglutarat zurückverwandelt. Das hydrierte Nicotinamid-Koenzym kann den Wasserstoff auf die Atmungskette oder auf andere Systeme übertragen (28).

Der auf diese Weise in den Geweben freigesetzte Ammoniak wird in der Leber ständig zur Harnstoffsynthese und zur Bildung von Glutamat benutzt.

Die gute Reversibilität der GldH-Reaktion ermöglicht ferner in Kombination mit der Transaminierung die Fixierung von freiem Ammoniak (39).

Die herausragende Bedeutung der GldH sehen SCHWARZLOSE und HEIM (50) darin, daß es als einziges Enzym aus α -Ketoglutarat und freiem Ammoniak Glutamat bilden kann.

Anmerkung : $X-T$ = Transaminasen entsprechender Aminosäuren

Die G1DH hat - trotz ihres umstrittenen Aussagewertes bei isolierter Aktivitätssteigerung im Serum - in Verbindung mit den Transaminasen und anderen klinisch chemischen Parametern in der Diagnostik der Lebererkrankungen Bedeutung erlangt.

Betrachtungen des (GOT + GPT)/G1DH-Quotienten in Verbindung mit den einzelnen Enzymaktivitäten können wertvolle Hinweise zur Beurteilung ikterischer Erkrankungen geben.

Tabelle 1

Hinweise für die Differentialdiagnose des Ikterus (4):

Krankheit	(GOT + GPT)/G1DH
Akute Hepatitis auch mit cholestatischen Einschlag	über 50
Akuter Schub bei Cirrhose	30 - 40
Chronische Hepatitis	30 - 40
Verschlußikterus	5 - 15
Metastasen-Leber	unter 10
Cholestatische Hepatose	40 - 50

DONATH (9) konnte mit Hilfe des GPT/G1DH-Quotienten die oben erwähnten differentialdiagnostischen Hinweise nicht bestätigen, fand aber, daß dieser Quotient mit einem Grenzwert von 15 sicher zwischen einer akuten Hepatitis und einem akuten Gallenwegverschluß unterscheiden läßt.

Extrem hohe G1DH-Aktivitäten wurden auch bei akutem Rechtsherzversagen mit plötzlichem Anstieg des zentralen Venendruckes beobachtet.

Der Vergleich mit einem Kollektiv, das an akuter Virushepatitis erkrankt war, ergab bei ähnlichen Erhöhungen der Transaminasen eine vierzigfach höhere G1DH-Aktivität beim akuten Rechtsherzversagen. (19).

KLEISSL (19) stellte bei seinen Untersuchungen weiter fest, daß der Vergleich der G1DH-Aktivität mit der parallel bestimmten Alaninaminotransferase-Aktivität nicht nur über den Grad der Parenchymschädigung, sondern auch über die Lokalisation der Nekrose im Leberläppchen Aufschlüsse gibt.

Schließlich sei noch erwähnt, daß KOSSMANN (31) in einem bestimmten Prozentsatz von Patientenseren, die normale Transaminasen aufwiesen, mit der nicht optimierten und der optimierten Methode eine erhöhte G1DH-Aktivität nachweisen konnte. Dabei war die isolierte Erhöhung der Enzymaktivität bei Frauen relativ häufiger als bei Männern.

Der Verfasser weist darauf hin, daß bei seinen Untersuchungen die isolierte Erhöhung der G1DH-Aktivität im Serum weder in unscharfen Normalwertgrenzen, fehlerhaften Meßbedingungen bzw. Meßverfahren noch in statistischen Fehlinterpretationen begründet sei.

2. Das Vorkommen der G1DH im Tier- und Pflanzenreich

Die Glutamat-Dehydrogenase ist ein im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitetes Zellenzym.

G1DH E.C.1.4.1.2. kommt in höheren Pflanzen, Hefen und im Cytosol von Fusarien vor.

G1DH E.C.1.4.1.4. findet man in Hefen, in Fusarienmitochondrien und in Bakterien.

G1DH E.C.1.4.1.3. ist das Enzym im Warmblütergewebe (49).

Dieses Enzym ist das einzige der Aminosäureoxidasen, das ein Pyridinnukleotid als Koenzym verwendet.

Im Vergleich der Aminosäuresequenz der G1DH aus Hühner- und Rinderleber und aus Neurospora fällt eine große Ähnlichkeit auf, die auf das Entstehen der G1DH aus einer gemeinsamen Urform schließen läßt (57).

Im menschlichen Organismus kommt die G1DH E.C.1.4.1.3. universell vor.

Es wurden folgende Aktivitäten in den einzelnen Organen gefunden.

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der Aktivitäten des Enzyms im menschlichen Organismus (37)

Organe	%
Leber	76
Niere	9
Gehirn	6
Lunge	6
Herz	2
Skelettmuskulatur	1

Tabelle 3

Enzymaktivität in U/g Frischgewicht (49)

Organ	U/g
Leber	38
Herz	1,1
Skelettmuskulatur	0,5
Erythrozyten	0,01

Die G1DH ist somit in der Leber, vorwiegend in den Mitochondrien der Leberläppchen, lokalisiert.

1968 gelang DI PRISCO (39) der Nachweis von G1DH-Aktivität in gereinigten Zellkernfraktionen aus Rattenleberzellen.

In der Zwischenzeit wurden mit verfeinerten Methoden G1DH-Aktivitäten auch in anderen Zellkompartimenten festgestellt (3).

Tabelle 4

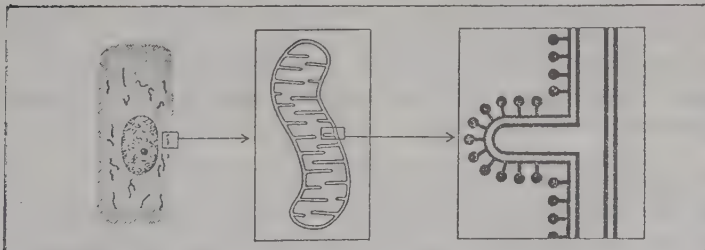
	U/g Frischgewicht
Totalaktivität	174,0 $\pm$ 15,6
relative Verteilung	
Nukleare Fraktion	18,4 $\pm$ 6,0
Mitochondrale Fraktion	60,3 $\pm$ 7,2
Lysosomale Fraktion	2,1 $\pm$ 0,5
Mikrosomale Fraktion	6,6 $\pm$ 0,9
Zytoplasma	0,8 $\pm$ 0,008

Die Glutamat-Dehydrogenase kann aufgrund ihrer bevorzugten Lokalisation in der Zelle in zwei Formen eingeteilt werden, in eine mitochondriale und eine nukleare, die immunologische und funktionelle Besonderheiten aufzeigen.

Die mitochondriale Form befindet sich, wie die Enzyme des Zitronensäurezyklus', in der sogenannten Mitochondrienmatrix, einer amorphen oder ganz feinen granulären, fädigen bzw. vesikulären Grundsubstanz, die durch eine Hülle zweier Einheitsmembranen vom Zytoplasma abgegrenzt wird. Diese Doppelmembran stellt für viele Stoffwechselmetabolite, unter anderem auch für die GlDH, unter physiologischen Bedingungen eine wirksame Diffusionsbarriere dar.

Abbildung 2

Schematische Darstellung von Mitochondrien in licht- und elektronenmikroskopischer Dimension (52)



3. Die chemische und immunologische Struktur der GLDH

Das Enzym hat ein Molekulargewicht von ca. $2,2 \times 10^6$ (2). Es setzt sich aus acht Untereinheiten, mit je einem Molekulargewicht von $2,8 \times 10^5$, zusammen (55).

Auf der Enzymoberfläche gibt es vier Bezirke, die durch ihre Aminosäuresequenzen und deren räumliche Anordnung für das Verhalten bzw. für die verschiedenen Funktionen des Enzyms verantwortlich sind:

Ein "aktiver Ort", an dem die Katalyse abläuft.

Ein "regulativer Ort", an dem verschiedene Regulatoren die Katalyse zusätzlich beeinflussen können.

Zwei "Assoziationsseiten" für das Zustandekommen von größeren Enzym-Substrat- bzw. Enzym-Enzym-Komplexen (23).

Es wurde ferner gefunden, daß man das Enzym in drei verschiedene Komponenten unterteilen kann, die sich durch unterschiedliches immunologisches und katalytisches Verhalten auszeichnen:

Die "Komponente A" ist verantwortlich für die GLDH-Aktivität.

Die "Komponente C" zeigt Alanindehydrogenase-Aktivität.

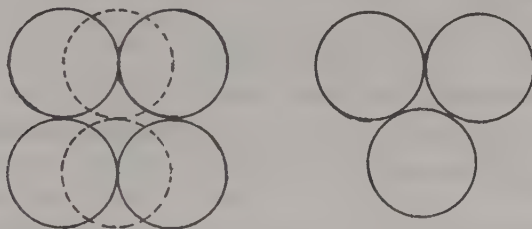
Die "Komponente B" umfaßt beide Aktivitäten. (54)

Es ließ sich ferner zeigen, daß sich alle drei Komponenten aus gleichen Untereinheiten zusammensetzen, die inaktiv, immunologisch aber identisch mit der "Komponente C" sind.

Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich dadurch erklären, daß für die enzymatische Wirkung eine ganz bestimmte Struktur erforderlich ist, die aber bei der Zerlegung in die Untereinheiten verloren geht, die immunologische jedoch erhalten bleibt (54).

Abbildung 3

Schematische Darstellung der funktionellen Struktur
des Enzyms (23)



Die kleinste aktive Untereinheit der GLDH besteht aus sechs identischen Polypeptidketten, die zu jeweils einer Dreiergruppe in zwei Schichten angeordnet sind und ein sogenanntes Hexamer darstellt (23). Dieses Modell schließt verschiedene Bindungsbezirke zwischen und innerhalb der Schichten ein.

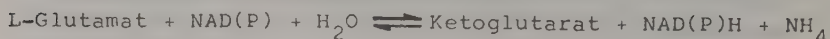
KOBERSTEIN (30) zeigte nun, daß diese Untereinheit im Ganzen achtzehn Nukleotid-bindende Seiten hat, die sich in drei Gruppen zu je sechs zusammenfassen lassen.

"Gruppe I", mit den sogenannten aktiven Seiten, wird sowohl von NADH als auch von NADPH besetzt.

"Gruppe II", mit den sogenannten nicht aktiven Seiten, wird von NADH, NADPH, ADP und Leucin besetzt. Allerdings sind die Bindungen an die Pyridinnukleotide nicht so fest, wie an die aktiven Seiten; zudem wird NADPH wesentlich schwächer gebunden als NADH.

"Gruppe III" ist für die Anlagerung von GTP zuständig.

Die durch das Enzym katalysierte Reaktion wird wie folgt beschrieben:



Die Gleichgewichtskonstante für die Reaktion liegt bei:

$$K = \frac{\alpha\text{-Ketoglutarat} \times \text{NAD(P)H} \times \text{NH}_4}{\text{Glutamat} \times \text{NAD(P)} \times \text{H}_2\text{O}} = 4,5 \times 10^{-14}$$

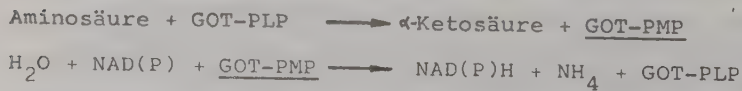
Die Reaktion wird also in vivo bevorzugt in Richtung der Glutamat-Synthese ablaufen (49).

Die Möglichkeit, mit den Substraten Enzym-Substrat-Komplexe bilden zu können, ist grundlegend für den katalytischen Ablauf der GldH-Reaktion und sehr wichtig für den Stoffwechsel.

Es ergibt sich hier die Gelegenheit, in vivo die Richtung und die Zahl der Katalysen durch die Edukte und Produkte der Reaktion ganz fein zu steuern (7).

Einen weiteren Vorteil bringt der Enzym-Enzym-Komplex der GldH mit einer Transaminase. Seine physiologische Aufgabe besteht darin, Aminosäuredehydrogenasenreaktionen mit solchen Aminosäuren durchzuführen, die keine große Affinität zur GldH jedoch zur Transaminase haben (11).

So ist im Fall des Tyrosins, das nicht direkt mit der GldH reagiert, folgender Reaktionsablauf beschrieben:



(PLP = Pyridoxalphosphat; PMP = Pyridoxaminphosphat)

Die Reaktion läuft also in zwei Schritten ab, wobei der letztere durch die GldH, die mit dem GOT-eigenen Pyridoxalphosphat bzw. Pyridoxaminphosphat reagiert, ohne daß diese prosthetischen Gruppen im Enzymverband von der GOT auf die GldH übertragen werden, katalysiert wird.

4. Die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von lokalen und biochemischen Einflüssen

Im Gehirn scheint der GLDH neben der katalysierenden oxidativen Desaminierung eine weitere bedeutende Rolle zu zukommen, nämlich die der Synthese der Neurotransmittersubstanz Glutamat. Welche der beiden Funktionen des Enzyms überwiegt, ist noch nicht geklärt (34).

Die von DI PRISCO (39) beschriebenen nuklearen und mitochondrialen GLDH-Fraktionen weisen sowohl bei der oxidativen Desaminierung als auch bei der Glutamat-bildenden Reaktion teils Übereinstimmung, teils unterschiedliches vom Reaktionsmilieu bestimmtes Reaktionsverhalten auf. Da beide Fraktionen auch unterschiedliche antigene Determinanten haben, kann auf eine unterschiedliche Proteinstruktur der Enzyme geschlossen werden.

Die enzymatische Aktivität der GLDH kann durch verschiedene Substanzen geregelt werden, die sich an den drei oben genannten "Gruppen" anlagern und die Wechselwirkung innerhalb und zwischen den aktiven Untereinheiten, die für die Funktion des assoziierten Enzyms eine entscheidende Rolle spielen, ändern.

In "Gruppe I" wird unter Einwirkung von ADP das negative Zusammenspiel bzw. die unterschiedlichen Dissoziationskonstanten innerhalb der sechs aktiven Seiten aufgehoben.

In "Gruppe II" werden in Anwesenheit von ADP anstatt zwölf Moleküle NAD(P)H nur noch sechs pro Oligomer gebunden, was sich aus der Konkurrenz beider Stoffe um die Bindungen der "Gruppe II" erklären läßt. ADP ist somit ein kompetitiver Hemmstoff zu NAD(P)H im Hinblick auf die nicht aktiven Seiten der Untereinheit (30).

GTP verstärkt die Bindung zwischen NADH und Enzym durch intergruppale Wechselwirkungen mit den NADH-bindenden Bezirken der Untereinheiten. Mit NADPH wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

Glutamat verhält sich ähnlich wie GTP, auch wenn es sich nicht an die GTP-spezifischen Seiten anlagert (30).

Nach MARKAU (32) zeigt ADP über den gesamten pH-Bereich zwei Wirkungen gegenüber NAD. Zum einen beobachtet man ein Ansteigen von $V_{\max}$ mit gleichzeitigem Anstieg der Michaeliskonstanten für NAD. Dieser Effekt bedeutet eine Aktivierung bei hohen und eine Hemmung der Reaktion bei niedrigen NAD-Konzentrationen. Zum anderen findet sich eine kompetitive Hemmung mit $K_i = 6 \text{ mM}$, was zu einer noch stärkeren Hemmung bei niedrigen NAD-Werten führt.

Es wird weiterhin gezeigt, daß das Verhältnis von Hemmung zu Aktivierung mit fallendem pH und steigender Phosphatkonzentration ansteigt, und alle beobachteten Wirkungen auf eine einzige Adenin-bindende "subsite" an den Koenzymbindenden Seiten der "Gruppe II" zurückzuführen sind.

In einer weiteren Studie wurden vier Wirkungen von Leucin auf den Reaktionsablauf festgestellt (33):

Eine Aktivierung der Reaktion infolge der Unterdrückung der Substrathemmung durch Glutamat.

Eine kompetitive Hemmung von Glutamat: $K_i = 130 \text{ mM}$.

Ein Anstieg der Michaeliskonstanten bei relativ kleinen Leucin-Konzentrationen.

Eine Steigerung von $V_{\max}$.

Die beiden letzten Wirkungen lassen sich erklären, wenn die ternären Enzym-Glutamat-NAD- und Enzym- α -Ketoglutarat-NADH-Komplexe in die Betrachtung einbezogen werden.

Die bei der Feinstruktur der Mitochondrien schon angesprochene innere Mitochondrienmembran besteht unter anderem aus Phospholipiden, von denen neben dem Lecithin und dem Kephalin vor allem das Kardiopolin, das mit zwei Phosphatgruppen im Molekül und keinem entsprechenden positiven Gegenpol die größte negative Dichte aller mitochondrialen Lipide bei physiologischen pH-Werten aufweist, Einfluß auf die GLDH-Reaktion nimmt, indem ein inaktiver Enzym-Lipid-Komplex gebildet wird. Dieser Aktivitätsverlust (bis zu 90 %) läßt sich durch die komplexbedingten Strukturveränderungen des Enzyms bzw. der Enzymuntereinheiten erklären (8).

DODD (8) stellte in seiner Arbeit weiter fest, daß sich bei Erhöhung der Ionenkonzentration im Reaktionsmilieu durch Salze (NH_4Cl) der Enzym-Kardiopolin-Verbund wieder auflöst und somit die Hemmung reversibel ist.

Eine Erhöhung der Ionenkonzentration in der Matrix bewirkt eine Auflösung des Verbundes und führt somit zu einer Aktivitätssteigerung. Falls ein erhöhter NH_4 -Spiegel die "Komplexlyse" induziert, wird durch eine sofortige Glutamatbildung und H-Ionenpufferung die ursprüngliche Ionenkonzentration wieder hergestellt und das Enzym durch Bindung an die Mitochondrienmembran inaktiviert (8).

Die durch Metabolite induzierte Komplexbildung bestimmt den jeweiligen Standort des Enzyms.

Bedingungen, die die Affinität von Glutamat zur GLDH erhöhen, lockern die Bindungen zwischen Enzym und Mikrosomen.

Glutamat fördert die inaktive Enzym-Kardiopolin-Verbindung und verhindert die "Komplexlyse".

Glutamat und NAD bewirken im Cytosol eine Verlagerung des Enzyms von den Mikrosomenmembranen, dem Enzymsyn-

theseort, zu den Mitochondrienmembranen. Dadurch läßt sich möglicherweise die Richtung der Reaktion regulativ beeinflussen.

Der größere Reduktionszustand der Pyridin-Nukleotide an der der Matrix zugewandten inneren Mitochondrienmembran induziert die Dissoziation des Enzyms von der Membran in die Matrix.

Da das Kardiolipin in vivo durch seine reversible Bindung an das Enzym dieses inaktiviert, ist eine Erklärung für die bevorzugte Oxydation des Glutamats über die Transaminierung und nicht über die oxidative Desaminierung gegeben.

In Anwesenheit von NADH ist die Affinität zur Komplexbildung wesentlich geringer als bei NAD. Dies könnte die Reduktion von α -Ketoglutarat in NADH-reichem Milieu erklären (16).

In der Literatur ist über die NAD- bzw. NADP-Spezifität der Reaktion folgendes beschrieben:

In den Mitochondrien der Rattenleber kann die GldH mit NAD und NADP reagieren, ohne Rücksicht auf den Energiezustand des Mitochondriums zu nehmen.

Wenn das Substrat der Reaktion in genügend hoher Konzentration vorliegt, katalysiert das Enzym eine Wasserstoffübertragung zwischen den beiden Nukleotiden, um den Zustand der Redoxsysteme von NAD und NADP anzugleichen.

Der Reduktionsgrad von NADP relativ zu NAD wird durch die relativen Aktivitäten der energieabhängigen Wasserstoff-Übertragenden Enzyme und der GldH bestimmt.

Der gleichzeitige Ablauf beider Wasserstoff-Übertragender Reaktionen stellt einen energieverchwenderischen Prozeß dar, der durch eine induzierte ADPase-Aktivierung

bedingt ist, und in vivo bei Stickstoffvergiftungen diskutiert wird (22).

Untersuchungen von JUNG (25) zeigen eine Hemmung menschlicher GLDH mit wachsender Calciumkonzentration, die durch Zugabe von ADP wieder aufgehoben werden kann. Es liegt ein nichtkompetetiver Hemmungstyp vor.

Aufgrund dieser Resultate wird die Möglichkeit der intramitochondralen Beeinflussung der GLDH-Aktivität durch Calcium, dessen mitochondrale Konzentration vom jeweiligen Energiezustand des Mitochondriums abhängt, erörtert.

Bei Neurospora wurde eine teilweise Inaktivierung der NAD-spezifischen GLDH durch Harnstoff gesehen, die auf einer Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten beruht, und in Anwesenheit von NADH und α -Ketoglutarat eine beschleunigte restitutio ad integrum erfährt (18).

MULLEN (35) konnte nachweisen, daß die Verfütterung einer reinen Gerstendiät zu einem Aktivitätsanstieg der GLDH im Serum führt, der durch eine Veränderung der Mitochondrienpermeabilität bedingt sein könnte, die nach Absetzen der Diät voll reversibel ist.

RAJALKSHMI (40,41) zeigte ferner, daß der Körper, falls ihm keine Proteine zugeführt werden, körpereigene Substanzen, die leicht verfügbar sind, wie zum Beispiel alle Enzyme, so auch die GLDH, zuerst abbaut.

SCHWARZLOSE und HEIM (50) fanden bei Versuchen mit kastrierten und nicht kastrierten Mäusen, daß die GLDH-Synthese in der Niere der Maus vom Testosteronspiegel abhängt. Endogen oder exogen zugeführtes Testosteron induziert die Synthese von GPT, GOT und GLDH. Actinomycin D hemmt diesen Vorgang. Da diese Enzyme die Glutamat-Bildung bzw. durch Transaminierung des Glutamats den Aufbau anderer Aminosäuren (Alanin, Aspartat)

bewirken, nehmen sie direkt Einfluß auf die Eiweiß-synthese.

Auch in der Schwangerschaft kommt es zu Veränderungen der Enzymaktivität. So wird im menschlichen Myometrium eine nur leichte Erhöhung der mitochondrialen Enzyme (MDH-II, GLDH, Cytochrom-C-oxidase) festgestellt, die auf eine geringfügige Hyperplasie der Mitochondrien zurückzuführen ist, wohingegen die Plasmaenzyme (LDH, MDH-I) ihre Aktivität um das zehnfache steigern.

Im Myometrium des Rattenuterus verhalten sich die Zuwachsraten gerade umgekehrt (14).

Besondere Bedeutung kommt den Ergebnissen von GAETANO (13) zu, die den Einfluß chronischen Alkoholabususes auf die GLDH-Aktivität beschreiben.

So fällt die GLDH-Aktivität im Leberparenchym zwar stark ab, der erwartete Abstrom des Enzyms ins Blut findet aber nicht statt. Sogar bei akuter Alkoholvergiftung waren keine erhöhten Serumwerte festzustellen.

Die Ursache dieser Synthesestörung könnte beim alkoholbedingten Ansteigen des NADH/NAD-Quotienten in vivo liegen, zumal hohe NADH-Konzentrationen die GLDH-Aktivität in vitro erniedrigen.

Die Autoren glauben ferner, daß eine erniedrigte GLDH-Aktivität für die Hemmung der Gluconeogenese, für Hypoglykämien bei hungernden Menschen und bei Mäusen nach Alkoholgenuß, für die erniedrigte Harnstoffbildung und den gesteigerten Aminosäureverlust in alkoholgeschädigten Rattenlebern verantwortlich ist.

In einer Studie stellte GLAZER (15) fest, daß bei primären Lebertumoren eine Proportionalität zwischen einer erniedrigten GLDH-Aktivität, einer erhöhten α -Fetoproteinproduktion und einer erhöhten histologischen Entdifferenzierung besteht.

Psychopharmaka wie Haloperidol und Perphenazin hemmen die Enzymaktivität der GldH. Diese Hemmung der Enzymaktivität wird aufgehoben, wenn es zu einer Komplexbildung zwischen GldH und GOT kommt. Das Ausmaß der Enzymaktivitätshemmung der im Serum gemessenen GldH-Aktivitäten ist nicht bekannt (51).

Der GldH-Spiegel wird durch wirksame Dosen von Cortisonderivaten gesenkt. In Leber und Niere wurden Anstiege der GldH-Aktivität nach Gabe von Cortison, Glukagon, Tyroxin und proteinreicher Kost beschrieben. Sulfonylharnstoffe (orale Antidiabetika) hemmen die GldH.

III. M E T H O D E N

1. Allgemeine Enzymkinetik

Das Prinzip des optischen Testes nach WARBURG beruht auf der Oxydation des an der Reaktion beteiligten NADH zu NAD. Dieses Kosubstrat ist nicht in der Lage Licht der Wellenlänge $\lambda = 340 \text{ nm}$ zu absorbieren. Dies führt zu einer Extinktionsänderung der Reaktionslösung. Die Zu- bzw. Abnahme der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist ein direktes Maß der Reaktionsgeschwindigkeit bzw. der Enzymaktivität.

Die enzymatische Katalyse ist wie alle chemischen Reaktionen temperaturabhängig. Die Enzymaktivität nimmt mit steigender Temperatur - bedingt durch einen kinetischen Energiezuwachs der reagierenden Moleküle - zunächst zu. Nach Erreichen eines Temperaturmaximums fällt die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch meistens schnell ab, weil Enzyme als thermolabile Proteine bei Temperaturerhöhung zunehmend denaturiert werden (5).

Es ist bekannt, daß die Affinität der Enzyme zu ihren Substraten und Kosubstraten sowie das pH-Optimum der Reaktionslösung temperaturabhängig ist.

Von besonderer Bedeutung für die Enzymaktivität ist die Berücksichtigung des pH-Wertes im Reaktionsmilieu, da die katalytischen Eigenschaften der Enzyme sich in Abhängigkeit vom pH ändern. Dies beruht auf einer Entladung der reagierenden Gruppen des Enzyms im stärker sauren bzw. alkalischen Bereich.

Die Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion ist der Enzym- und Substratkonzentration proportional und wird mit steigender Konzentration von dieser unabhängig. Die Änderung der Geschwindigkeit mit der Substratkonzen-

tration wird durch die MICHAELIS-MENTEN- oder HENRI-
GLEICHUNG beschrieben:

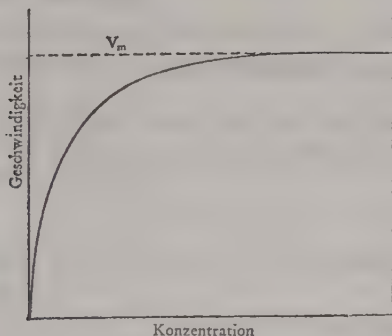
$$V = \frac{V_m \times S}{S + K_m}$$

S = gesamte Substratkonzentration

V_m = maximale Reaktionsgeschwindigkeit

K_m = Michaeliskonstante

Abbildung 4



(56)

Durch Zugabe von sogenannten Aktivatoren (ADP, Leucin) kann man das Verfahren optimieren, das heißt unter Ausnutzung der allosterischen Eigenschaften des Enzyms einen Verstärkereffekt erzielen.

Nach den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE ist bei Zugabe von ADP eine Aktivitätserhöhung um den Faktor 1,5 - 3,0 möglich.

JUNG (27) erwähnt eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 2,8 bei Zusatz von ADP und Leucin. Durch Leucin ist

auch eine Verbreiterung des schmalen optimalen NADH-Konzentrationsbereiches auf 0,3 - 0,4 nM beobachtet worden (36).

Der Vorteil dieser Effektorenkombination liegt nicht nur in einer erhöhten Aktivierung und einem verringerten ADP-Bedarf, sondern auch in einer Schutzwirkung des Reaktionssystems bei ungünstigen Meßbedingungen (z.B. hohe Temperaturen).

Es ist auch darauf zu achten, daß im Bestimmungsansatz mit den empirisch ermittelten optimalen Koenzymkonzentrationen gearbeitet wird, um die bestmögliche "Verstärkerwirkung" zu erzielen.

2. Die verglichenen Testverfahren

Folgende im Handel befindliche Biochemika zur Aktivitätsbestimmung der G1DH wurden verwendet:

Boehringer

Biochemica-Test-Combination = Boe UV akt (aut-man)
G1DH-aktiviert (A*) (A)

Glutamat-Dehydrogenase

"Optimierte Standard-Methode":

nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für
Klinische Chemie

UV-Test; Best.Nr. 15928 für 3x10 Bestimmungen;

Methode mit Ermittlung der unspezifischen Vorreaktion.

G1DH-aktiviert MONO TEST^R Boe Mono akt (B)

Glutamat-Dehydrogenase

"Optimierte Standard-Methode":

nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für
Klinische Chemie

UV-Test; Best.Nr. 15883 für 19 Bestimmungen;

Methode mit Ermittlung der unspezifischen Vorreaktion.

- Biochemica-Test-Combination = Boe Mono (C)
G1DH
Glutamat-Dehydrogenase (nicht aktiviert)
UV-Test; Best.Nr. 15995 für ca. 10 Bestimmungen;

Merck

Merck-I-Test^R = Me-I-Mono (D)
G1DH (Optimierter UV-Test)
nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für
Klinische Chemie.

Merckotest G1DH = Me UV akt (E)
(Optimierter UV-Test)
nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für
Klinische Chemie.

Test Boe Mono (C) Lab UV akt (F)
Zentrallabor optimiert

3. Konzentrationen von Substraten und Hilfsenzymen in den verschiedenen Testen

Übersicht über:

pipettierte Volumina im Bestimmungsansatz

	A	A *	B	C	D	E	F
Puffersubstrat- lösung (ml)	2,5	2,5	2,5	2,15	2,5	2,0	2,15
Serum (ml)	0,5	0,5	0,5	1,00	0,5	0,4	1,00
α -Ketoglutarat (ml)	0,1	0,1	0,1	0,15	**	0,2	0,005

** Puffersubstratlösung enthält α -Ketoglutarat

Konzentrationen im Bestimmungsansatz

		A	A *	B	C	D	E	F
TRA	mM	50	50	50	50	50	50	50
Ammonium- acetat	mM	100	100	100	3200	100	100	100
ADP	mM	1	1	1	-	1	1	1
NADH ₂	mM	0,2	0,2	0,2	12	0,2	0,2	0,2
EDTA	mM	2,5	2,5	2,5	4,0	2,5	2,5	2,5
LDH	U/l	2	2	2	-	2,5	1	-
α -Ketoglu- tarat	mM	7	7	7	410	7	7	-
Oxypolyäth- oxydodecan	g/l	-	-	-	-	8,3	8,3	-

die Versuchsdauer der Methoden

		A	A *	B	C	D	E	F
Inkubations-	min	3		3	20	5	5	20
zeit								
Mz.d.Vorre-	min	5		5	10	-	-	0,33
aktion								
Mz.d.Haupt-	min	5		5	10	5	5	0,33
reaktion								

Mz = Meßzeit der Vorreaktion bzw. Hauptreaktion.

4. Die verwendeten Geräte

Geräte bei der manuellen Bestimmung

Spektrallinienphotometer mit Wechselautomat (Eppendorf)
 Transformationsstufe 1853 (Eppendorf)
 Kompensationsschreiber 4412 (Eppendorf)
 Filter: 334 nm, 340 nm, 366 nm
 Wasserbad: thermomix 1440 (Braun)
 Thermostat (Haake, FJ)
 Pipetten: Kolbenpipetten
 Glaspipetten
 Reaktionsgefäße 3810 (Eppendorf)
 Küvetten 1x1 cm Nr. 45/1010 (sarstedt)
 Thermometer: Hg-Thermometer
 elektrisches Thermometer
 Stoppuhr

Geräte bei der automatischen Bestimmung

Eppendorf Automat 5010 Photometer 6111
 Programmer 5515 Enzymrechner 6450
 Probetisch 5124 Drucker 6522
 Inkubator 5311

übrige Geräte wie bei der manuellen Bestimmung.

5. Anleitungen zur Durchführung der Testverfahren

Bestimmungsansatz Boe UV akt (aut-man) und Boe Mono akt

In eine Küvette pipettieren	Konzentration im Test
Reaktionsgemisch (25°C) 2,5 ml	50 mM TRA, pH 8,0 100 mM Ammoniumacetat 1 mM ADP 0,2 mM NADH ₂ 2,5 mM ADTA 2 U/1 LDH
Serum 0,5 ml	
gut mischen und 3 Minuten bei 25°C stehen lassen, danach Extinktion E ₁ messen. Bei 25°C stehen lassen und genau 5 Minuten nach erster Extinktionsablesung Extinktion E ₂ messen (unspezifische Vorreaktion).	
d-Ketoglutarat 0,1 ml	7 mM d-Ketoglutarat
Zugeben, mischen und Extinktion E ₃ messen. Bei 25°C stehen lassen. Genau 5 Minuten nach dritter Ablesung Extinktion E ₄ messen. Extinktionsdifferenz (E ₁ -E ₂) von Extinktionsdifferenz (E ₃ -E ₄) abziehen = E.	

Bestimmungsansatz Boe Mono und (Lab UV akt)*

In ein Reagenzglas pipettieren	Konzentration im Test
Lösung 1 (TRA,EDTA) 2 ml	50 mM TRA; pH 8,0 4 (2,5) mM EDTA (4,0) mM ATP
Serum 1 ml	
Lösung 2 (Ammonium-acetat) 0,1 ml	3,2 (0,1) M Ammonium-acetat
Lösung 3 (NADH ₂) 0,05 ml	12 (0,2) mM NADH ₂
Mischen, ca. 20 Minuten bei 25°C im Wasserbad stehen lassen. In Küvette gießen, Extinktion E ₁ messen, bei 25°C stehen lassen. Genau 10 Minuten nach erster Ablesung Extinktion E ₂ messen. In den meisten Fällen ist E ₁ = E ₂ .	
Lösung 4 (d-Keto-glutarat) 0,05 ml	0,41(0,007)M d-Keto-glutarat
Mischen und Extinktion E ₃ messen, bei 25°C stehen lassen. Genau 10 Minuten nach dritter Ablesung Extinktion E ₄ messen. Dann Extinktionsdifferenz (E ₁ -E ₂) von Extinktionsdifferenz (E ₃ -E ₄) abziehen = E.	

* Sämtlich Werte im Klammern beziehen sich auf den Bestimmungsansatz Lab UV akt.

Bestimmungsansatz Me-I-Mono

Zum Inhalt einer Flasche 2 pipettieren		Konzentration im Test	
Puffer-Substrat- lösung Flasche 1	2,5 ml	50 mM	TRA; pH 8,0
		100 mM	Ammoniumacetat
		1 mM	ADP
		0,2 mM	NADH ₂
		2,5 mM	EDTA
		2 U/l	LDH
		8,3 g/l	Oxypoliäthoxy- dodecan
		7 mM	α-Ketoglutarat
Serum	0,5 ml		
Mischen, sofort in Küvette gießen, nach 5 Minuten die Extinktion bei 25°C messen und gleichzeitig auf die Stopuhr drücken. Messung jede Minute, 5 Minuten lang, wiederholen.			

Bestimmungsansatz Me UV akt.

In eine Küvette pipettieren	Konzentration im Test
Puffer-Koenzym- Aktivator-Lösung 2,0 ml	50 mM TRA; pH 8,0 100 mM Ammoniumacetat 1 mM ADP 0,2 mM NADH ₂ 2,5 mM EDTA 1 U/l LDH 8,3 g/l Oxipoliäth- oxydedocan
Serum 0,4 ml	
Mischen, etwa 5 Minuten bei 25°C stehen lassen.	
L -Ketoglutarat 0,2 ml	7 mM L -Ketogluta- rat
Sofort mischen, nach etwa 1 Minute die Extinktion bei 25°C messen und gleichzeitig auf die Stopuhr drücken. Messung jede Minute, 5 Mi- nuten (bei Seren im Normal- bereich 10 Minuten) lang, wiederholen.	

Berechnung der Volumenaktivität der G1DH im Serum

für die Tests Boe UV akt (aut-man) und Boe Mono akt

Volumenaktivität	=	207	•	E _{334nm}	(U/l)
Volumenaktivität	=	199	•	E _{340nm}	(U/l)
Volumenaktivität	=	376	•	E _{366nm}	(U/l)

für den Test Boe Mono

Volumenaktivität	=	53,3	•	E _{334nm}	(U/l)
Volumenaktivität	=	51,4	•	E _{340nm}	(U/l)
Volumenaktivität	=	97,0	•	E _{366nm}	(U/l)

für den Test Me-I-Mono

Volumenaktivität	=	E/min	•	1000 U/l	(334nm)
Volumenaktivität	=	E/min	•	968 U/l	(340nm)
Volumenaktivität	=	E/min	•	1818 U/l	(366nm)

für den Test Me UV akt

Volumenaktivität	=	E/min	•	1083 U/l	(334nm)
Volumenaktivität	=	E/min	•	1045 U/l	(340nm)
Volumenaktivität	=	E/min	•	1970 U/l	(366nm)

für den Test Lab UV akt

Volumenaktivität	=	•	E _{334nm}	(U/l)
------------------	---	---	--------------------	-------

6. Die Normalwerte

Nach den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE sind folgende Werte als physiologisch zu betrachten:

bei Frauen:	0 - 3 U/l	
Bei Männern:	0 - 4 U/l	(46).

Bei nicht optimierten Meßverfahren liegt die Normalwertsgrenze für Frauen und Männer bei 0,9 U/l.

IV. E R G E B N I S S E

1. Das Verhalten der G1DH-Aktivität in Seren bei Lagerung

In einer ersten Untersuchung wurde das Verhalten der G1DH-Aktivität im menschlichen Serum bei Lagerung über mehrere Tage bei 4°C beobachtet.

Es zeigte sich, daß sich innerhalb der ersten drei Tage die Aktivitäten gegenüber den Ausgangswerten wenig änderten und erst am vierten und fünften Tag abfielen.

Tabelle 5

Die Änderung der Enzymaktivität bei Lagerung

Ausgangsaktivitäten, n = 5:	0-10 U/l	11-20 U/l	20 U/l
Einbußen:	- 6 %	-15 %	-25 %

Da die Aktivitätsabnahmen in den Proben innerhalb der ersten 24 Stunden 5 % der Ausgangsaktivität nicht überschritten, wurden alle Untersuchungen in diesem Zeitintervall durchgeführt.

2. Kontrollmessungen

Die Methoden wurden anhand von Kontrollmessungen mit käuflichen Kontrollseren (Precipath E^R und Precinorm E^R) und selbst hergestelltem Poolserum auf Reproduzierbarkeit von vorgegebenen Werten geprüft.

Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

Tabelle 6

Biochemika	Kontr.Mess.i.d.Serie			Kontr.Mess.v.Tag z.Tag			
	n	x	Vk	n	x	Vk	
<u>Boe UV akt man</u>							
Precinorm E	366	18	9,21	2,34	14	9,01	5,36
	334	18	9,06	2,38			
Precipath E	366	18	15,90	1,85	14	16,80	8,74
	334	18	15,60	1,10			
Poolserum	366	18	4,69	2,57			
	334	18	4,41	2,21			
<u>Boe UV akt aut</u>							
Precinorm E	334	18		6,04			
Precipath E	334	18		4,71			
<u>Boe Mono akt</u>							
Precinorm E	366	20	9,82	2,12	14	9,23	6,72
	334	20	9,68	1,48			
Precipath E	366	20	18,15	1,96	14	16,24	5,61
	334	20	17,95	1,29			
Poolserum	366	20	7,44	5,10			
	334	20	7,21	4,72			
<u>Boe Mono</u>							
Precinorm E	366	18	0,64	7,43	14	0,68	12,18
	334	18	0,64	6,98			
Precipath E	366	18	1,44	7,08	14	1,53	13,34
	334	18	1,24	5,67			
Poolserum	366	18	0,98	8,70			
	334	18	0,78	7,93			

Biochemika	Kontr.Mess.i.d.Serie			Kontr.Mess.v.Tag z. Tag		
	n	x	Vk	n	x	Vk

Me-I-Mono

Precinorm E	366	20	9,70	2,10	14	8,50	6,20
	334	20	9,04	1,82			
Precipath E	366	20	15,25	2,30	14	15,09	7,90
	334	20	15,06	2,57			
Poolserum	366	16	4,94	3,51			
	334	16	4,94	4,21			

Me UV akt

Precinorm E	366	20	5,83	1,82	14	5,19	9,41
	334	20	4,89	2,08			
Precipath E	366	20	10,29	3,55	14	10,70	10,11
	334	20	9,94	3,52			
Poolserum	366	16	3,51	5,05			
	334	16	3,50	5,70			

Lab UV akt

Precinorm E	334	6	16,9	6,41
Precipath E	334	6	9,25	15,34

Die errechneten Variationskoeffizienten zeigen, daß die optimierten Methoden hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der in den Kontrollseren gemessenen Aktivitäten in der Serie und von Tag zu Tag präziser sind.

Die niedrigsten Vk und somit die höchste Präzision wurden mit den Verfahren Boe UV akt und Boe Mono akt ermittelt.

3. Die unspezifische Vorreaktion

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß es bei der GlDH-Aktivitätsbestimmung in der Anfangsphase der Messung zu nicht linearen Extinktionsänderungen kommen kann. Das Ausmaß dieser "Vorreaktion" wurde bei den verglichenen Analyseverfahren ermittelt.

In Tab. 7 sind die Mittelwerte der unspezifischen Vorreaktionen für die einzelnen Verfahren und der prozentuale Anteil der Vorreaktionen in Bezug auf die Gesamtenzymaktivitäten dargestellt.

Tabelle 7

Test $\lambda = 334$		n	$\bar{x}$ (U/l)	GA (U/l)	$\bar{x}$ (% v. 4 U/l)	[*] (0,9 U/l)
Boe UV akt aut	83	0,31	≤ 4		7,75	
	17	0,38	> 4			
	52	0,34	≤ 4		8,50	
	64	0,48	> 4			
Boe UV akt man	21	0,17	≤ 4		4,15	
	14	0,36	> 4			
	24	0,25	≤ 4		6,25	
	12	0,32	> 4			
	83	0,23	≤ 4		5,75	
	17	0,19	> 4			
	30	0,27	≤ 4		6,75	
	21	0,32	> 4			
	24	0,37	≤ 4		9,25	
Boe Mono akt	12	0,45	> 4			
	29	0,07	$\leq 0,9$		7,70	
	21	0,23	$> 0,9$			
	22	0,18	$\leq 0,9$		19,90	
	58	0,10	$> 0,9$			

Test 1 = 334	n	$\bar{x}$ (U/l)	GA (U/l)	$\bar{x}$ (%v.4 U/l)
Me UV akt	32	0,54	≤ 4	13,50
	17	0,59	> 4	
Lab UV akt	52	1,12	≤ 4	28,00
	56	1,00	> 4	

Test = 336

Boe Mono akt	12	0,00	≤ 4	0,00
	6	0,68	> 4	
	21	0,01	≤ 4	0,25
	9	0,04	> 4	
	19	0,49	≤ 4	12,25
	5	1,43	> 4	
Me UV akt	19	0,43	≤ 4	10,75
	5	0,88	> 4	

Die Mittelwerte der "Vorreaktion" wurden bei Seren mit einer Enzymaktivität bis zu 4 U/l in Prozent von 4 U/l angegeben.

Für Serum-GlDH-Aktivitäten bis zu 4 U/l sind die Mittelwerte der unspezifischen "Schleichreaktion" in Prozent der Gesamtaktivität nochmals in Tab. 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8

Boe UV akt aut	8,13 %
Boe UV akt man	6,25 %
Boe Mono akt	5,40 %
Boe Mono	13,80 %
Me UV akt	5,60 %
Lab UV akt	28,00 %

Der Merck-I-Test hat nach der Testbeschreibung des Herstellers keine Vorreaktion. Es wurden jedoch auch bei diesem Verfahren im nicht linearen Teil der Extinktionsänderung Aktivitäten ermittelt, die bis zu 11,8 % der Gesamtaktivität im Einzelfall betrugen.

4. Der Methodenvergleich

In 14 Versuchsserien wurden insgesamt 592 Patientenserien mit jeweils mindestens zwei der überprüften Analyseverfahren anhand von Doppelbestimmungen verglichen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Vergleichsmessungen mit Angabe der jeweiligen Regressionsgeraden, den Korrelationskoeffizienten und der T-Werte findet sich in Tab. 9 .

Tabelle 9

n	F = f(x)	R	λ	T-Wert
	Me-I-Mono = f(Boe Mono)			
79	y = 5,04x - 1,29	0,821	334	4,748
*	z = 0,87u + 1,37	0,889	334	11,642
	Boe UV akt aut = f(Boe UV akt man)			
100	y = 1,04x + 1,31	0,979	334	15,453
	Lab UV akt = f(Boe UV akt aut)			
100	y = 0,90x - 1,27	0,975	334	13,457
	Boe Mono akt = f(Boe UV akt man)			
36	y = 1,03x - 0,006	0,998	334	2,527
	Me UV akt = f(Me-I-Mono)			
25	y = 0,61x + 0,43	0,990	366	17,650
50	y = 0,67x + 0,35	0,990	334	24,370
	Me UV akt = f(Boe Mono akt)			
25	y = 0,64x + 0,85	0,990	366	10,220
	Me-I-Mono = f(Boe Mono akt)			
20	y = 1,01x - 0,02	1,000	366	0,605
25	y = 0,91x - 0,14	0,980	366	2,689
25	y = 1,06x + 0,70	1,000	366	3,420
36	y = 1,67x + 0,50	0,981	334	6,219
	Me-I-Mono = f(Boe UV akt man)			
35	y = 0,67x + 0,19	0,993	334	3,639
36	y = 0,70x + 0,51	0,977	334	3,162

* Gleichung für logarithmisch transformierte Werte.

Vergleichende Untersuchungen einer nicht optimierten (Boe Mono) und einer optimierten (Me-I-Mono) Aktivitätsbestimmung der G1DH im Serum

Es wurden in 79 unausgesuchten Patientenseren Aktivitätsmessungen durchgeführt, deren Ergebnisse mit der nicht optimierten Methode zwischen 0,2 - 11,5 U/l, mit der optimierten Methode zwischen 0,5 - 94,5 U/l lagen. Mit beiden Methoden wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse wurde für jede Methode die Varianz über die gesamten Enzymkonzentrationsbereiche innerhalb der Doppelbestimmungen ermittelt. (Tab. 10).

Tabelle 10

	G1DH optimiert	G1DH nicht optimiert
Varianz	0,256	0,505
Standardabweichung	0,506	0,710

Hinsichtlich dieser Berechnungen darf eine größere Ungenauigkeit beim nicht optimierten Verfahren angenommen werden.

In Abb. 5 sind die nach beiden Methoden bestimmten Enzymaktivitäten von 79 Patientenseren gegeneinander aufgetragen.

Es errechnete sich eine Regressionsgerade von

$$y = 5,04x - 1,29$$

bei einem Regressionskoeffizienten von $r = 0,821$ und einem T-Wert von 4,748. Die Ergebnisse der nach beiden Verfahren bestimmten Enzymaktivitäten sind voneinander signifikant unterschieden. Da die diesen Berechnungen zugrunde liegenden Meßwerte nicht normalverteilt erscheinen, wurde durch logarithmische Umformung in eine log-Normalverteilung erreicht.

Eine mit diesen Werten durchgeführte Regressions- und Korrelationsberechnung ergab eine Steigung von 0,87 und einen Achsenabschnitt von 1,37. Der Regressionskoeffizient betrug 0,889 und der T-Wert 11,642 (s. Abb. 6).

In 6,3 % der untersuchten Patientenserum zeigte sich, daß die Mittelwerte der Serumaktivitäten, die für die nicht optimierte Methode nahezu identisch waren, mit der optimierten Methode signifikante Unterschiede aufwiesen (Abb.7).

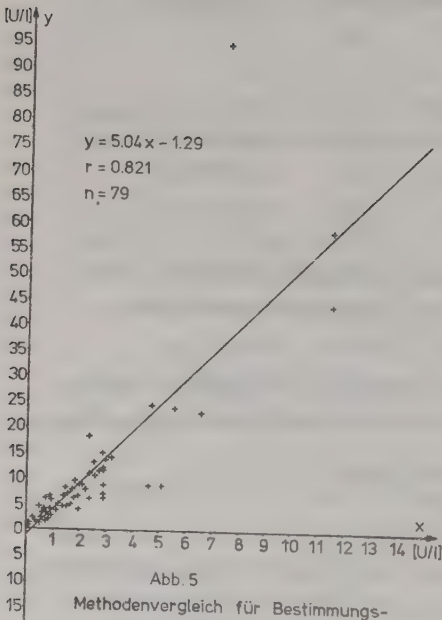


Abb. 5
Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
x=Boehringer GIDH (nicht aktiviert)
y=Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

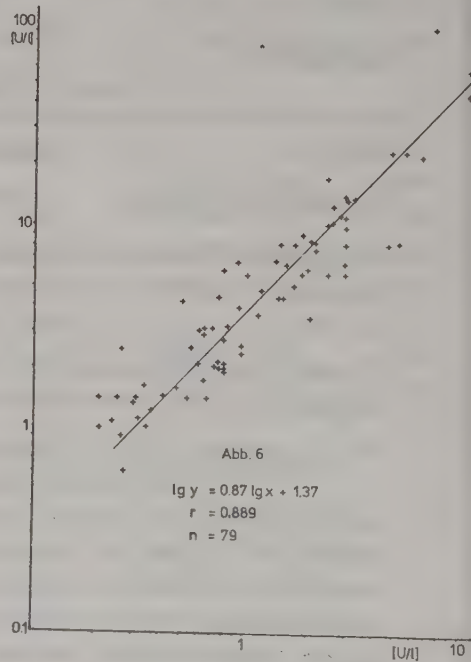
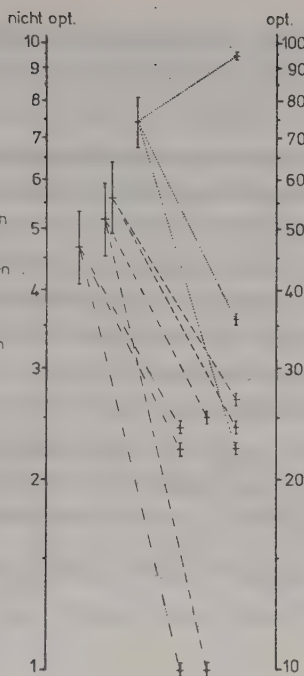


Abb. 6

Abb. 7
Messungen, die mit der nicht optimierten Methode nahezu identische Aktivitäten ergaben, zeigten große Differenzen mit der optimierten Methode.



Vergleichende Untersuchungen eines optimierten Bestimmungsverfahrens (Boe LV akt aut-man) bei unterschiedlicher Durchführung der Messung (aut = voll-automatisiert; man = manuell)

Es wurden in 100 unausgesuchten Patientenseren Aktivitäten bestimmt, die mit der manuellen Bestimmungsmethode zwischen 0,2 - 16,5 U/l und mit dem automatischen Verfahren zwischen 1,2 - 19,8 U/l lagen.

In 83 Proben, deren Gesamtaktivitäten unter 4 U/l lagen und die maschinell ermittelt wurden, waren im Mittel Probeleerwerte von $\bar{x} = 0,31$ U/l (7,75 % der Gesamtaktivität abzuziehen; bei den selben Proben jedoch manuell

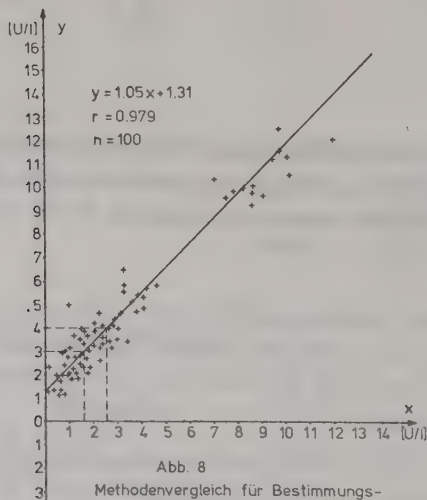
gemessen- betrug $\bar{x} = 0,23 \text{ U/l}$ (5,75 % der Gesamtaktivität).

Im Einzelfall wurden bei den Leerwertbestimmungen (Reaktionsablauf ohne Zugabe von Startreagenz) Extinktionsänderungen ermittelt, die einer Enzymaktivität von bis zu 35 % der jeweiligen Gesamtaktivität entsprachen.

Für die bei einer Wellenlänge von $\lambda = 334 \text{ nm}$ und 25°C nach beiden Verfahren bestimmten 100 Enzymaktivitäten errechnete sich die Regressionsgleichung $Y = 1,04x + 1,34$ und ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,979$ bei einem T-Wert von 15,453.

Daraus ergibt sich ein signifikanter Unterschied für die Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessung des unterschiedlich durchgeführten Analyseverfahrens.

In Abb. 8 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.



Der Vergleich von Enzymaktivitäten, die mit den Verfahren Boe UV akt man und Boe Mono akt bestimmt wurden.
(verschiedene Testreihen eines Herstellers)

Es wurden in 36 unausgesuchten Patientenseren die Enzymaktivitäten bestimmt. Nach der Methode Boe Mono akt war bei 24 Enzymaktivitäten, die unter 4 U/l lagen, eine mittlere Vorreaktionsaktivität von 0,37 U/l (9,25 % der Gesamtaktivität) abzuziehen, bei 12 Enzymaktivitäten, die über 4 U/l lagen, eine solche von 0,45 U/l.

Nach der Methode Boe UV akt man waren bei entsprechenden Werten unter 4 U/l 0,25 U/l, bei solchen über 4 U/l 0,32 U/l in Abzug zu bringen.

Die Regressionsgerade für 36 Wertepaare lautet:

$$y = 1,03x - 0,006 \quad r = 0,998$$

Ein T-Wert von $T = 2,52$ (für 35 Freiheitsgrade) berechtigt zur Ablehnung der Nullhypothese, d.h. daß die mit beiden Testverfahren ermittelten Werte nicht signifikant verschieden sind (s. Abb.9).

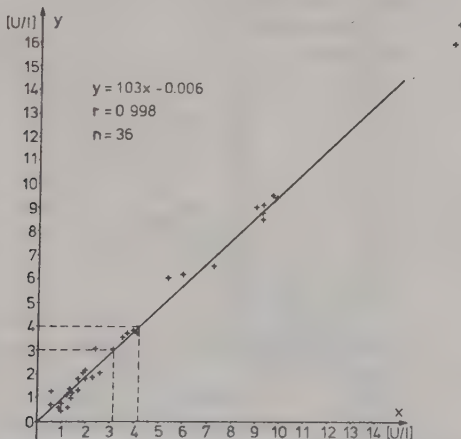


Abb. 9

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
 x = Boehringer GIDH aktiviert MONOTEST
 y = Boehringer GIDH aktiviert (für 3x10 Best.)

Der Vergleich von Enzymaktivitäten, die mit den Verfahren Boe UV akt aut und Lab UV akt bestimmt wurden.

Es wurde die Enzymaktivität in 100 unausgesuchten Patientenserum nach beiden Methoden ermittelt. Bei Werten, die mit Lab UV akt bestimmt wurden und die unter 4 U/l lagen, mußten durchschnittlich 1,12 U/l, bei denen über 4 U/l im Mittel 1,0 U/l subtrahiert werden.

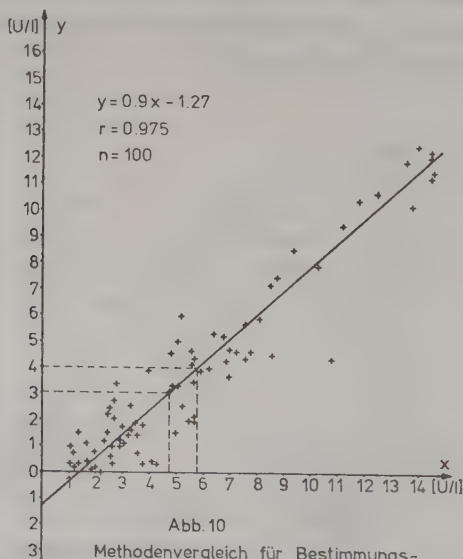
Demgegenüber waren nach der Methode Boe UV akt aut bis 4 U/l 0,34 U/l und über 4 U/l 0,48 U/l abzuziehen.

Es errechnete sich eine Regressionsgleichung:

$$y = 0,9x - 1,27 \quad r = 0,975 \quad T = 13,45$$

Daraus resultiert ein signifikanter Unterschied zwischen den miteinander verglichenen Testverfahren.

In Abb. 10 sind die ermittelten Meßwerte gegeneinander aufgetragen.



Der Vergleich von Enzymaktivitäten, die mit den Verfahren Me-I-Mono und Me UV akt bestimmt wurden.

Mit diesen beiden vom gleichen Hersteller vertriebenen Testverfahren wurden 75 Vergleichsmessungen durchgeführt. Diese erfolgten in zwei Meßreihen. Die errechneten Regressionsgleichungen

$$y = 0,61x + 0,43$$

bzw.

$$y = 0,67x + 0,35$$

bei T-Werten von

$$T = 17,65$$

und

$$T = 24,37$$

zeigten, daß die mit beiden Testverfahren ermittelten Werte signifikant unterschieden waren.

Die Ergebnisse dieser Meßreihen sind in Abb. 11 und 12 dargestellt.

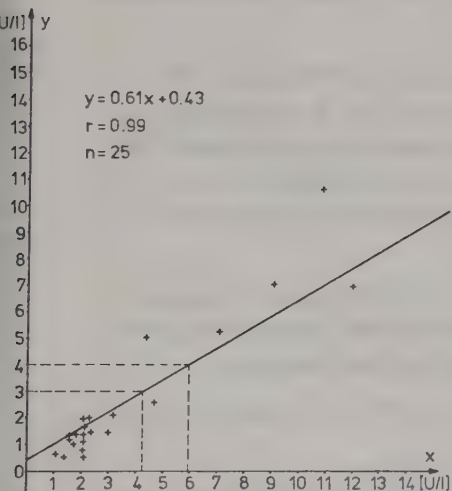


Abb. 11

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum

x = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

y = Merckotest GIDH (optimierter UV-Test)

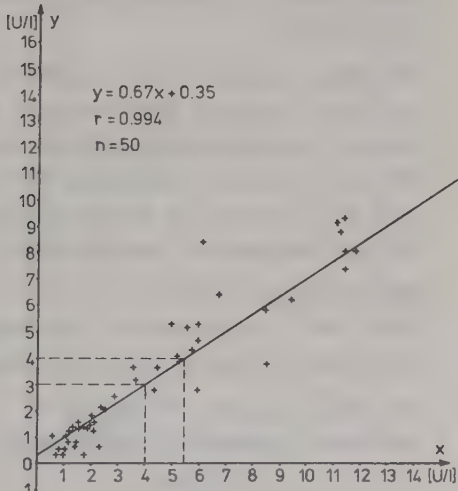


Abb. 12

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum

x = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

y = Merckotest GIDH (optimierter UV-Test)

Der Vergleich von Enzymaktivitäten, die mit den Verfahren Boe Mono akt und Me-I-Mono bestimmt wurden.

Beide Methoden wurden in vier Meßreihen miteinander verglichen und ergaben dreimal ähnliche Regressionsgleichungen:

$$y = 1,01x - 0,02 \quad r = 1,00 \quad T = 0,605$$

$$y = 1,06x + 0,70 \quad r = 1,00 \quad T = 3,240$$

$$y = 0,91x - 0,14 \quad r = 0,98 \quad T = 2,689$$

Eine weitere Untersuchung mit Testkombinationen, die jeweils aus neueren Lieferungen stammten und deren Zusammensetzungen sich inzwischen weder qualitativ noch quantitativ geändert haben sollten, ergab eine gegenüber den früher ermittelten Ergebnissen einen deutlich erniedrigten Regressionskoeffizienten $b_{x/y} = 0,67$.

Eine Regressionsgleichung von $y = 0,67x + 0,5$ bei $r = 0,981$ und $T = 6,219$ zeigte, daß die nach beiden Testverfahren ermittelten Werte signifikant unterschiedlich waren.

Im physiologischen Aktivitätsbereich wurden die gegenüber früheren Bestimmungen um ca. 30 % niedriger liegenden Regressionskoeffizienten gemessenen Enzymaktivitäten durch den relativ großen Achsenabschnitt, der bei 4 U/l ca. 12,5 % der Gesamtaktivität ausmachte, in ihrem Aussagewert angeglichen.

Welches Testverfahren seine Leistungsfähigkeit gegenüber der Erfassung von Enzymaktivitäten gesteigert bzw. verringert hat, kann nicht beantwortet werden.

In Abb. 13, Abb. 14, Abb. 15 und Abb. 16 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

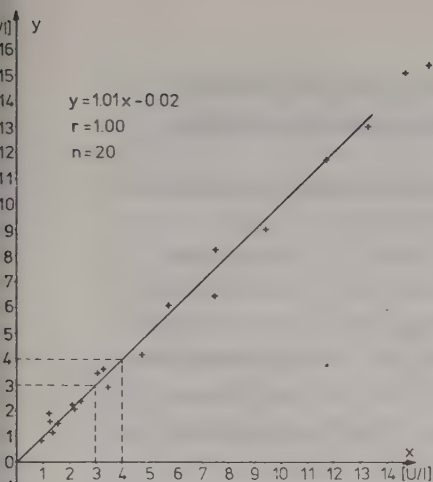


Abb. 13

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
 x = Boehringer GIDH aktiviert MONOTEST
 y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

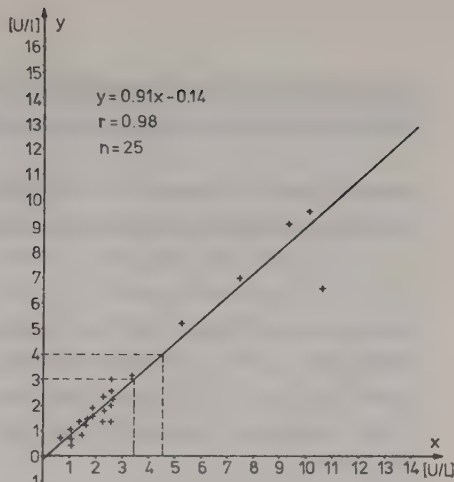


Abb. 14

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
 x = Boehringer GIDH aktiviert MONOTEST
 y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

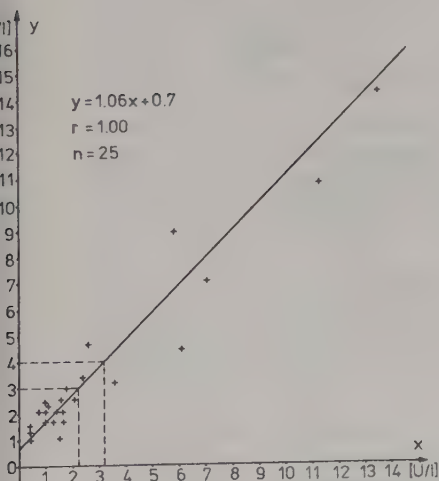


Abb. 15

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
 x = Boehringer GIDH aktiviert MONOTEST
 y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

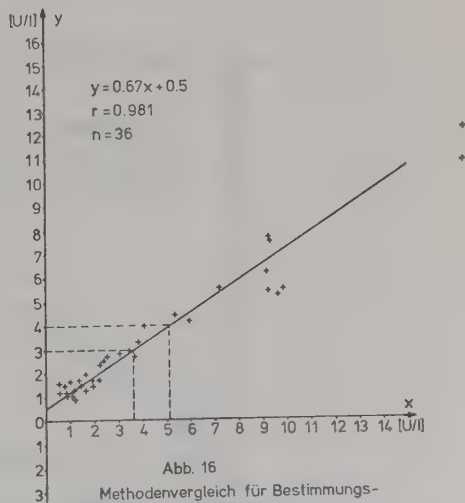


Abb. 16

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum
 x = Boehringer GIDH aktiviert MONOTEST
 y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

Der Vergleich von Enzymaktivitäten, die mit den Verfahren Boe UV akt man und Me-I-Mono bestimmt wurden.

Anhand zweier Serien von Vergleichsmessungen wurden fast übereinstimmende Regressionsgleichungen

$$y = 0,7x + 0,51 \quad r = 0,977 \quad T = 3,162$$

$$y = 0,76x + 0,19 \quad r = 0,993 \quad T = 3,639$$

erzielt, aus denen zu entnehmen ist, daß mit der Testkombination Boe UV akt -ebenso wie mit Boe Mono akt - eine bis zu 25 % höhere Enzymaktivität in der selben Probe bestimmt werden kann, als mit der Testkombination Me-I-Mono.

Die aus den Wertepaaren beider Meßtage errechneten T-Werte zeigen den signifikanten Unterschied der verglichenen Methoden.

Eine graphische Darstellung der Meßergebnisse findet sich in Abb. 17 und Abb. 18.

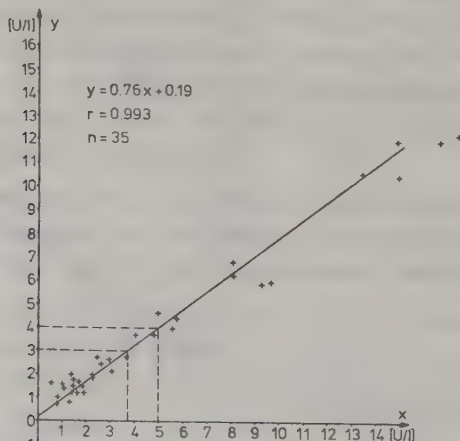
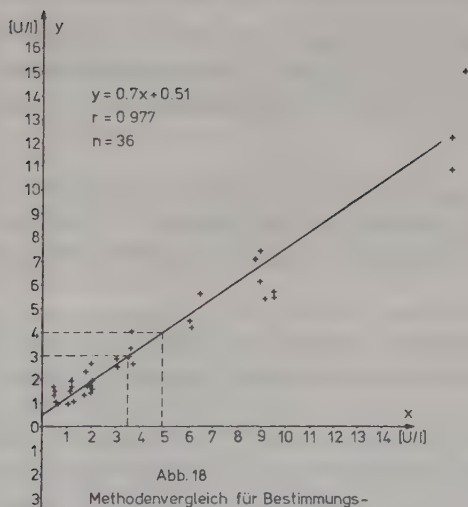


Abb. 17

Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum

x = Boehringer GIDH aktiviert (für 3x10 Best.)

y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)



Methodenvergleich für Bestimmungsmethoden der GIDH im Serum

x = Boehringer GIDH aktiviert (für 3×10 Best.)

y = Merck-1-Test GIDH (opt. UV-Test)

V. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war zum Ersten der Vergleich zwischen der nicht aktivierten G1DH-Enzymaktivitätsmessung im Serum und aktivierten Nachweisverfahren. Die Testzusammensetzung für die aktivierte G1DH-Aktivitätsmessung richtet sich nach den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (43).

Aufgrund von Angaben in der Literatur wird ein unterschiedliches Ergebnis der G1DH-Aktivitätsbestimmung mit verschiedenen "aktivierten" Analyseverfahren in den gleichen Seren vermutet.

Deshalb sollte zweitens die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen in gleichen Patientenserum mit verschiedenen aktivierten Verfahren überprüft werden.

Im nicht aktivierten Nachweisverfahren ist der Substratumsatz pro Zeiteinheit niedrig. Dies hat geringe Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit zur Folge. Von SCHMIDT und SCHMIDT (49) wurde erstmals ein G1DH-Aktivitätsmessungsverfahren mit ADP als Aktivator beschrieben. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse wurde von der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE die Testzusammensetzung für ein optimiertes Meßverfahren empfohlen.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Vorteile des optimierten Verfahrens. Die größeren Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit ermöglichen eine exakte Bestimmung der Enzymaktivität und eine bessere Präzision in der Serie bzw. von Tag zu Tag (Tab. 6).

Voraussetzung ist die genaue Einhaltung der beteiligten Reagenzien-Konzentrationen im Testansatz, da schon geringe Abweichungen von der "optimalen" Konzentration zu verminderten Extinktionsänderungen pro Zeiteinheit führen und somit fälschlich zu niedrige Werte für die Enzymaktivität ermittelt werden.

Durch ADP-Zusatz wird eine Aktivitätssteigerung um den Faktor 1,5 - 3,0 in der Literatur beschrieben (49). ADP hemmt die Dissoziation der einzelnen Untergruppen des GldH-Gesamt moleküls und führt somit zu einer rascheren Enzym-Substrat-Komplexbildung. Ein weiterer Effekt neben der Beschleunigung der Enzym-Substrat-Komplexbildung ist die Stabilisierung der Katalysatorwirkung. In Anwesenheit von ADP ändert sich innerhalb von fünf Stunden die GldH-Aktivität im Serum bei Raumtemperatur nicht und nimmt bei 37°C im gleichen Zeitraum nur um 10 % ab. Dagegen wird im gleichen Serum ohne ADP-Zusatz nach fünf Stunden bei Raumtemperatur ein Aktivitätsverlust von 8 % und bei 37°C von 27 % beobachtet (10).

Stabilisierende Wirkung hat auch der im optimierten Testverfahren vorgeschriebene Triäthanolamin-Puffer, der zusätzlich einen plötzlichen Zusammenbruch der optimalen NADH-Konzentration und somit einer Bestimmung im suboptimalen Kosubstrat-Bereich mit entsprechender Ergebnisverfälschung entgegen wirkt (10).

Die Zugabe von Leucin senkt den ADP-Bedarf und vergrößert den optimalen NADH-Konzentrationsbereich auf 0,3-0,4 mmol/l (32). Die Zugabe von Leucin ist in den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE für die Durchführung einer GldH-Aktivitätsmessung im Serum unter optimalen Bedingungen noch nicht berücksichtigt.

In den untersuchten Patientenserum fanden sich mit optimierten Methoden Meßwerte zwischen 1 und 100 U/l, denen Enzymaktivitäten zwischen 0,1 und 20 U/l - gemessen mit der nicht optimierten Methode - gegenüberstanden. Zur Frage der Umrechenbarkeit der ermittelten Enzymaktivitäten mußten die erhaltenen Meßwerte auf das Vorliegen einer Normalverteilung überprüft werden. Hierbei fand sich eine log-Normalverteilung. Bei kritischer Durchsicht der Angaben über die Umrechenbarkeit in der Literatur (43, 49) muß festgestellt werden, daß keiner der Autoren, die von ihm erhaltenen Meßwerte auf das Vor-

liegen einer Normalverteilung überprüft hat. Aus diesem Grund wird der aus den nicht transformierten Meßergebnissen erhaltene Umrechnungsfaktor den Resultaten in der Literatur gegenüber gestellt. Beim Vergleich der optimierten (y) mit der nicht optimierten (x) Methode ergibt sich eine Regressionsgerade mit der Formel

$$y = 5,04x - 1,29.$$

Dies entspricht den Angaben in der Literatur (49). Der konstante Faktor von -1,29 wirkt sich hauptsächlich bei niedrigen Enzymaktivitäten aus. Für die transformierten Ergebnisse ergibt sich folgende Regressionsgerade:

$$\lg y = 0,87 \lg x + 1,37.$$

Der Korrelationskoeffizient r verbessert sich gegenüber den nicht transformierten Werten von 0,821 auf 0,889 (Abb. 5 und 6).

Obwohl eine globale Umrechenbarkeit möglich erscheint, ergeben sich im Einzelfall erhebliche Abweichungen zwischen erhaltenen Meßwerten und entsprechenden rechnerisch zu erwartenden Ergebnissen. Diese Differenzen lassen eine Umrechenbarkeit individueller Werte fraglich erscheinen. In 6,3 % der untersuchten Patientenseren, die nach der nicht optimierten und einer optimierten Methode bestimmt wurden, zeigte sich, daß die nach der optimierten Methode erhaltenen Analyseergebnisse signifikant von den zu erwartenden rechnerisch ermittelten Resultaten abwichen. So wurden zum Beispiel für drei Seren, deren G1DH-Aktivität gemessen mit dem nicht aktivierten Bestimmungsverfahren 7,5 U/l betrug, folgende Aktivitäten mit einem "aktivierten" Analyseverfahren ermittelt:

Serum 1 : 22 U/l

Serum 2 : 35 U/l

Serum 3 : 95 U/l.

Die Ursache dieser individuellen Unterschiede können durchaus in differenten Isoenzym-Mustern in den betreffenden Patientenseren begründet sein (17).

Nach Angaben in der Literatur wird vorgeschlagen, bei Routineuntersuchungen der GLDH-Aktivität in den Patientenseren auf die Bestimmung eines individuellen Probenleerwertes zu verzichten und 0,3 U/l als konstanten Faktor von der in der Hauptreaktion ermittelten Serumaktivität abzuziehen (20). Eigene Untersuchungen an 100 Patientenseren, die mit der Testkombination Boe UV akt aut (auf Eppendorff 5010) durchgeführt wurden, bestätigen dieses Ergebnis, da in 83 Proben mit Serum-GLDH-Aktivitäten bis 4 U/l im Mittel Probenleerwerte von 0,31 U/l beobachtet wurden, das sind 7,75 % der gefundenen Gesamtaktivität.

Diese 100 Patientenseren wurden mit den gleichen Reagenzien (Boe UV akt aut) sowohl an einem mechanisierten als auch an einem manuellen Arbeitsplatz untersucht. Dabei fand sich bei den Enzymaktivitätsmessungen an dem vollmechanisierten Meßplatz eine konstante Erhöhung der Ergebnisse um 1,34 U/l. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden anderer Untersucher (20).

In der vorliegenden Untersuchung kann gezeigt werden, daß nicht nur der unspezifischen Vorreaktion, sondern auch der Hauptreaktion eine nicht lineare Extinktionsänderung vorausgeht. Diese nicht lineare Extinktionsänderung kann sich je nach untersuchtem Serum über einen Zeitraum von 0 - 2 Minuten erstrecken. Das für die Durchführung der Analyse eingesetzte vollmechanisierte Analysegerät Eppendorff 5010 beginnt mit der Messung der Extinktionen schon 20 Sekunden nach Zugabe des Startreagenz (α -Ketoglutarat), sodaß zu hohe Enzymaktivitäten erfaßt werden.

Dieser systematische Fehler tritt bei der manuellen Bestimmung nicht auf, da zur Berechnung der Enzymaktivitäten nur der lineare Anteil der Extinktionsänderung ausgewertet wird.

Der Vergleich der Methode Boe UV akt man mit der Methode Boe UV akt aut ergibt, daß beide Testverfahren identische Ergebnisse liefern. Die Regressionsgleichung lautet:

$$y = 1,03x - 0,006.$$

Der Vergleich der Methoden Boe UV akt aut und Lab UV akt führt zur Regressionsgleichung:

$$y = 0,9x - 1,27.$$

Hierbei fällt auf, daß die mit dem Testverfahren Lab UV akt ermittelten Enzymaktivitäten um den konstanten Faktor 1,27 U/l niedriger liegen.

Wird für die erhaltenen Analyseergebnisse ein t-Test nach STUDENT errechnet, ergibt sich ein T-Wert von 13,45. Dies macht wahrscheinlich, daß die konstante Erniedrigung von 1,27 U/l unabhängig von der individuellen Enzymaktivität ist, das heißt, daß sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Enzymaktivitäten jeweils ein um 1,27 U/l niedrigeres Analyseergebnis zu erwarten ist.

Aus der Steigung der Regressionsgeraden von 0,9 ergibt sich, daß die mit der Methode Lab UV akt überprüften Aktivitäten zusätzlich um 10 % niedriger liegen, als die mit der Methode Boe UV akt aut ermittelten.

Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse, die beide Verfahren liefern, könnte durch ungleiche Zusammensetzung der Reaktionslösungen in den Testansätzen oder aber durch den hohen prozentualen Anteil der unspezifischen Vorreaktion an der Gesamtaktivität des Enzyms bei der Methode Lab UV akt begründet sein.

Die globale Umrechenbarkeit der mit beiden optimierten Verfahren ermittelten Werte ineinander ist mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,97$ bei einem n von 100 gegeben.

Beim Vergleich der Enzymaktivitäten, die mit den Methoden Me-I-Mono und Me UV akt bestimmt wurden, fällt auf, daß die mit der Methode Me-I-Mono bestimmten Werte signifikant höher liegen als die mit der Methode Me UV akt ermittelten. Die Umrechenbarkeit der nach beiden Methoden erhaltenen Meßwerte ineinander ist durch einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,98$ bei einem n von 50 gewährleistet. In zwei Analyseserien wurden folgende Regressionsgleichungen errechnet:

$$y = 0,61x + 0,43$$

$$y = 0,67x + 0,35$$

Bei der Überprüfung der Präzision ergibt sich für das Verfahren Me UV akt ein größerer Variationskoeffizient. Diese geringere Präzision ist vermutlich auf das Pipettierverhalten der Puffer-Substratlösung dieser Analysemethode zurückzuführen.

Zum einen war es nicht möglich mit der Kolbenpipette konstante Volumina über längere Zeit zu pipettieren, da die Pipette nach kurzem Gebrauch nicht mehr in der Lage war, das gehobene Volumen in der Pipettenspitze zu halten; zum anderen war bei noch so vorsichtigem Einfüllen der Lösung in die Meßküvette eine nicht unbeträchtliche Schaumbildung zu beobachten.

Gegenüber dem Verfahren Me-I-Mono findet sich eine Vermehrung der Pipettierschritte auf drei gegenüber zwei. Bei der Durchführung des Analyseverfahrens Me-I-Mono konnte auch überhaupt keine Schaumbildung beobachtet werden.

Diese schlechte Übereinstimmung der manuellen mit der für mechanische Analysegeräte vorgesehenen Methode widerspricht den Bemühungen vergleichbare Ergebnisse durch Serienmessungen und Einzelanalysen zu erhalten. Dies ist um so unverständlicher, als es sich um die Reagenzien eines Herstellers handelt.

Beim Vergleich der Methoden Boe Mono akt und Me-I-Mono fällt auf, daß sich in drei Meßreihen an verschiedenen Meßtagen und unter den gleichen Meßbedingungen nahezu übereinstimmende Ergebnisse ergaben.

Die Änderung des Achsenabschnittes von 0,14 bis 0,7 ist vermutlich durch die beim Test Boe Mono akt innerhalb eines bestimmten Bereiches schwankende, bei dem Verfahren Me-I-Mono nicht beobachtete Extinktionsänderung während der unspezifischen Vorreaktion bedingt.

Eine weitere zu einem späteren Zeitpunkt zur Überprüfung der erzielten Übereinstimmung durchgeführte Vergleichsmessung konnte diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Es fanden sich konstant niedrigere Enzymaktivitäten, wenn die Messung mit dem Verfahren Me-I-Mono ausgeführt wurde. Da die Meßbedingungen unverändert waren, kommt wahrscheinlich eine Änderung der Testzusammensetzung durch den Hersteller in Frage. Als Hinweis dafür mag gelten, daß einer der Hersteller seine angegebenen Normbereiche in dieser Zeit revidierte, von normal 8 U/l auf 4 U/l.

Der ebenfalls durchgeführte Vergleich zwischen den Verfahren Boe UV akt man und Me-I-Mono am gleichen Tag wie die Vergleichsuntersuchung Boe Mono akt und Me-I-Mono bestätigte die nahezu identischen Ergebnisse von GLDH-Enzymaktivitätsmessungen mit den Verfahren Boe UV akt und Boe Mono akt. Es wurde für den Methodenvergleich Me-I-Mono und Boe UV akt eine in Steigung und Achsenabschnitt fast gleiche Regressionsgerade gefunden, wie für den Vergleich zwischen Me-I-Mono und Boe Mono akt.

Zusammenfassend kann gesagt werden:

1. Bei den optimierten Verfahren bestehen in den Meßergebnissen unter Anwendung der Produkte verschiedener Hersteller signifikante Unterschiede.
2. Bei den Testzusammensetzungen der beiden überprüften Hersteller kann nur bei einem die geforderte Übereinstimmung der Ergebnisse bei Anwendung von Mono-Test und Automaten-Test bestätigt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym Glutamat-Dehydrogenase in Bezug auf seinen Wirkungsbereich, seine Beeinflußbarkeit durch endogene und exogene chemische und physikalische Einflüsse, seinen differentialdiagnostischen Aussagewert für klinische Bereiche, die Problematik der Untersuchungsmethoden, insbesondere die globale und individuelle Umrechenbarkeit von Enzymaktivitäten ineinander, die mit verschiedenen Methoden bestimmt wurden, und die Präzision der Verfahren untersucht bzw. miteinander verglichen.

Es wurde festgestellt, daß die GldH unter Berücksichtigung weiterer für die Erkrankung der Leber bedeutungsvoller klinisch chemischer Parameter eine sichere Abgrenzung pathologischer Syndrome erlaubt, und dadurch eine wertvolle Ergänzung zu den bisher üblichen leberdiagnostischen Möglichkeiten darstellt.

Das optimierte Verfahren sollte sich trotz der Verschiebung der Normalwertsgrenze von 0,9 U/l (nicht optimierte Methode) zu 3 bzw. 4 U/l (optimierte Methode) und der Unterschiedlichkeit von Meßergebnissen aus einem Serum - bedingt durch die Testkombinationen verschiedener Hersteller - gegenüber dem nicht optimierten in der klinischen Routineuntersuchung durchsetzen, da entscheidende Vorteile des substrat-optimierten Verfahrens in Bezug auf Umrechenbarkeit und Präzision der einzelnen Methoden nicht zu verkennen sind.

VII. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- (1) BENNINGHOFF, A.: Lehrbuch der Anatomie des Menschen.
Hrsg. D.K. Goertler; München, Berlin, Wien;
Bd. I ¹⁰1968, 58; Bd. II ⁹1971, 158; Bd. III
⁸1967, 281.
- (2) BERGMAYER, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analyse.
Weinheim/Bergstr.; ²1970; Bd. I, 420.
- (3) BISCHOFF, E., THUY-ANH, TRAN-THI, K.F.A. DECKER:
Nucleotide Pyrophosphatase of Rat Liver.
Eur. J. Biochem. 51, 1975, 353.
- (4) BOEHRINGER MANNHEIM, (hrsg.): Test-Fibel.
Mannheim; ¹1971.
- (5) BUDDECKE, E.: Grundriß der Biochemie.
Berlin; ²1971, 21.
- (6) CAVALLI - SFORZA, L.: Biometrie.
bearb. v. R. Lorenz; Stuttgart; ⁴1974.
- (7) CROSS, D.G., L.L. MC. GREGOR, H.F. FISHER: The bin-
ding of α -ketoglutarate in a binary complex
and in a ternary complex with NADP^+ by L-glu-
tamate dehydrogenase.
Biochim.et Biophys.Acta 289, 1972, 28.
- (8) DODD, G.H.: The interaction of glutamate dehydro-
genase and malate dehydrogenase with phos-
pholipid membranes.
Eur. J. Biochem. 33, 1973, 418.
- (9) DONATH, R.: Ein Beitrag zur diagnostischen Wertig-
keit des GPT/G1DH-Quotienten für die Differential-
diagnose von Lebererkrankungen.
Dtsch. Ges.wesen 27, 1972, 37, 1749.
- (10) ELLIS, G., D. GOLDBERG: Optimal conditions for the
kinetic assay of serum glutamate dehydrogenase
activity at 37°C .
Clin. Chem. 18, 6, 1972, 523.

- (11) FAHIEN, L., S.E. SMITH: The enzyme-enzyme-complex of transaminase and glutamate dehydrogenase. J. Biol. Chem. 249, 9, 1974, 2696.
- (12) FRIEDEN, C.J.: Glutamic dehydrogenase. III. The order of substrate addition in the enzymatic reaction. J. Biol. Chem. 234, 1954, 2891.
- (13) GAETANO, I., R. DE FRANCHIS, E. DEL NINNO, N. DIOGUARDI: Decrease of rat liver glutamate dehydrogenase after chronic administration of ethanol. Enzymologia 43, 1972, 245.
- (14) GEYER, H., M. RIEBSCHLÄGER: Effect of pregnancy on cytoplasmic and mitochondrial enzymes in human and animal myometrium. Acta Endocrinologica 77, 1974, 368.
- (15) GLAZER, R.I., CH.L. VOGEL, I.R. PATEL, P.P. ANTHONY: Glutamate dehydrogenase activity related to histopathological grade of hepatocellular carcinoma in man. Cancer Research 34, 11, 1974, 2875.
- (16) GODINOT, C., H.A. LARDY: Biosynthesis of G1DH in rat liver. Demonstration of its microsomal localisation and hypothetical mechanism of transfer to mitochondria. Biochemistry 12, 5, 1973, 2051.
- (17) GOMI, K.: Studies of L-G1DH. II. L-G1DH isoenzymes. Jap. J. Clin. Pathol. 21, 11, 1973, 925.
- (18) GROVER, A.K., M. KAPPOR: Urea-induced inactivation and dissociation of NAD-specific glutamate dehydrogenase of neurospora and its reversal by substrates. Can. J. Biochem. 51, 1973, 363.

- (19) GUDER, W.G., A. HABICHT, J. KLEISSL, U. SCHMIDT, O.H. WIELAND: The diagnostic significance of liver cell inhomogeneity: Serum enzymes in patients with central liver necrosis and the distribution of glutamate dehydrogenase in normal human liver.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 1975, 311.
- (20) HAECKEL, R.: A simple kinetic procedure for the optimized determination of the activity of serum glutamate dehydrogenase (E.C.1.4.1.2.) with an enzyme analyzer.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11, 1973, 184.
- (21) HAUSS, W.H., H.J. LEPPELMANN: Über Änderung von Fermentaktivitäten im Serum als Ausdruck einer unspezifischen Reaktion des Organismus.
Klin. Wschr. 35, 1957, 65.
- (22) HOECK, J.B., L. ERNSTER, E.J. DE HAAN, J.M. TAGER: The nicotinamide nucleotide specificity of glutamate dehydrogenase in intact rat-liver mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 333, 1974, 546.
- (23) HUCHO, F., W. DEBERT, H. SUND: Analysis of functional groups of bovine liver GLDH through chemical modification.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 353, 5, 1972, 717.
- (24) HUCHO, F., M. JANDA: Investigation of the quaternary structure of beef liver glutamate dehydrogenase with bifunctional reagents.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 57, 4, 1974, 1080.
- (25) JUNG, K., A. SOKOLOWSKI, E. EGGER: Influence of Ca^{2+} -ions on the activity of human liver glutamate dehydrogenase.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 354, 1, 1973, 101.

- (26) JUNG, K.: Ein Farbttest zur Bestimmung der Glutamamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum.
Klin. Chim. Acta 36, 1972, 231.
- (27) JUNG, K., E. EGGER, R. NEUMANN, B. LÜDTKE: Zum Einfluß der Temperatur auf Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum: Glutamamat-Dehydrogenase.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 12, 1974, 159.
- (28) KARLSON, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Stuttgart; ⁸1972, 144.
- (29) KING, J.: Farbttest.
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analyse. (2) Bd. I, 613.
- (30) KOBERSTEIN, R., H. SUND: Studies of glutamate dehydrogenase: the influence of ADP, GTP and L-glutamate on the binding of the coenzyme of beef liver glutamate dehydrogenase.
Eur. J. Biochem. 36, 1973, 545.
- (31) KOSSMANN, K.T.: Isolierte Erhöhung der Glutamamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum.
Med. Klin. 68, 1973, 1030.
- (32) MARKAU, K., J. SCHNEIDER, H. SUND: Kinetic studies of the mechanism of the action of ADP on the glutamate dehydrogenase reaction.
Febs Letters, 24, 1, 1972, 32.
- (33) MARKAU, K., I. STEINHÜBEL: Kinetic measurements with monocarboxylic acids as substrates and effectors of glutamate dehydrogenase.
Febs Letters, 28, 1, 11, 1972, 115.
- (34) MARTINEZ-RODRIGUEZ, R.: Histochemical location of glutamic dehydrogenase and aspartate amino-transferase in chicken cerebellum.
Brain Research 69, 1974, 31.

- (35) MULLEN, P.A.: Barley beef: Serum enzyme activity during barley feeding, and particularly during the introduction of the ration. Br. vet. J. 129, 1973, 439.
- (36) PERSIJN, J.-P., W. VAN DER SLIK, C.J. TIMMER: Kinetic measurement of serum glutamate dehydrogenase activity in the presence of oxamic acid and L-leucine. Clin. Chim. Acta 30, 1970, 377.
- (37) PRELLWITZ, W.: Klinisch-chemische Diagnostik. Stuttgart; ¹1972, 4.
- (38) PRENCIPE, L., L.P. SASSI, R. MERONI, E. DENEGRİ: La glutamato deidrogenasi: significato diagnostico e prognostico. Anm. Ist. Super. Sanità 7, 1971, 387.
- (39) PRISCO, G. DI, F. GAROFANO: Purification and some properties of glutamate dehydrogenase from ox liver nuclei. Biochem. Biophys. Res. Comm. 58, 3, 1974, 683.
- (40) RAJALAKSHMI, R., M. PARAMESWARAN, S.D. TELANG, C.V. RAMAKRISHAN: Effects of undernutrition and protein deficiency on glutamate dehydrogenase and decarboxylase in rat brain. J. Neurochem. 23, 1974, 129.
- (41) RAJALAKSHMI, R., M. PARAMESWARAN, C.V. RAMAKRISHAN: Effects of different levels of dietary protein on brain glutamate dehydrogenase and decarboxylase in young albino rats. J. Neurochem. 23, 1974, 123.
- (42) RAPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie. Berlin ⁵1969, 420.

- (43) RECOMMENDATIONS OF THE GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY (Hrsg.): Standardisation of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids. Experimental basis for the optimized standard conditions.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 4, 10, 1972, 187.
- (44) RECOMMENDATION OF THE GERMAN SOCIETY FOR CLINICAL CHEMISTRY (Hrsg.): Standardisation of methods for the estimation of enzyme activities in biological fluids. Experimental basis for the optimized standard conditions.
Supplement to the standard method for determination of glutamate dehydrogenase (G1DH) activity.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 8, 12, 1974, 392.
- (45) RICK, W.: Klinische Chemie und Mikroskopie.
Berlin, Heidelberg, New York; ¹1972, 146; 193.
- (46) SCHLEBUSCH, H., W. RICK, H. LANG, M. KNEDEL:
Normbereiche der Aktivitäten klinisch wichtiger Enzyme.
Med. Wschr. 99, 1974, 765.
- (47) SCHMIDT, E., F.W. SCHMIDT: Aspekte der Enzymdiagnostik.
Sonderdruck Boehringer Mannheim; o. J.
- (48) SCHMIDT, E., F.W. SCHMIDT: Enzymfibel.
Boehringer Mannheim 1966.
- (49) SCHMIDT, E.: Glutamat-Dehydrogenase. UV-Test.
in: Bergmeyer, H.U.: Methoden der Enzymatischen Analyse. (2) Bd. I, 607.
- (50) SCHWARZLOSE, F., F. HEIM: Effect of testosterone on glutamate-pyruvate-transaminase, glutamate-oxaloacetate-transaminase and glutamate dehydrogenase in mice kidneys.
Life Sci. 12, II, 1973, 107.

- (51) SHEMISA, O.A., L. FAHIEN: Effects of tranquilizers on the glutamate dehydrogenase - glutamate oxalacetate-transaminase complex.
Mol. Pharmacol. 9, 1973, 726.
- (52) STAUBESAND, J.: Bau und Funktion tierischer Zellen. Grundriß einer allgemeinen Cytologie.
in: Benninghoff, A.: Lehrbuch der Anatomie des Menschen. (1) Bd. I, 17.
- (53) SZASZ, G.: 8. Internationaler Kongreß Klinische Chemie. Kopenhagen 1972.
in: Jung, K., et al.: Zum Einfluß der Temperatur auf Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum: Glutamat-Dehydrogenase. (27), 159.
- (54) TALAL, N., G.M. TOMKINS, J.F. MUSHINSKI, K.L. YIELDING: Immunochemical evidence for multiple molecular forms of crystalline glutamic dehydrogenase.
J. Mol. Biol. 8, 1964, 46.
- (55) WARREN, J.C., D.O. CARR, S. GRISOLIA: Effect of cofactors, oestrogens and magnesium ions on the activity and stability of human glutamate dehydrogenase.
Biochem. J. 93, 1964, 409.
- (56) WILLIAMS, A.: Enzyme.
Stuttgart; ¹1972, 24.
- (57) WOOTTON, J.C.: The coenzyme-binding domains of glutamate dehydrogenase .
Natur. 252, 12, 1974, 542.

Herrn Prof. Dr. P r e l l w i t z möchte ich für die Überlassung des interessanten Themas mit dieser vielseitigen Aufgabenstellung danken. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. P r e l l w i t z besonders für die volle Unterstützung dieser Arbeit und für die Überlassung wichtiger Unterlagen und Hilfsmittel.

Herrn Dr. K a p p danke ich für seine ständige Gesprächsbereitschaft und die hilfreiche Beratung bei der Bewältigung schwieriger Probleme.

Herrn Prof. Dr. S c h ö l m e r i c h, Direktor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universitätskliniken Mainz, danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Mein Dank gilt insbesondere auch meiner Verlobten Fräulein Monika Allmann, ohne deren Mithilfe die schriftliche Abfassung dieser Arbeit in der vorliegenden Form weit schwieriger gewesen wäre.

LEBENS LAUF

Am 7.11.1950 wurde ich als einziges Kind des Malermeisters Georg Sparrer und seiner Ehefrau Emilie, geb. Horter, in Niederlustadt, Kreis Germersheim, geboren.

Von 1956-1960 besuchte ich die Volksschule Niederlustadt, wechselte dann zum Staatlich Neusprachlich-Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Gymnasium Germersheim und legte am 2.7.1970 die Reifeprüfung ab.

Anschließend diente ich als Soldat vom 1.10.1970 - 31.3.1971 in Koblenz bei der Fm Kp 6/III und vom 1.4.1971 - 15.4.1971 beim 4. Fm Btl. 310 als Funker und Fernmelder.

Aufgrund meiner Zulassung zum Studium der Medizin im Sommersemester 1971 an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz wurde ich vorzeitig vom Dienst in der Bundeswehr freigestellt, mit der Auflage, die restliche Wehrdienstzeit nach Abschluß meines Studiums abzuleisten.

Die Naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich am 23.3.1972, die Ärztliche Vorprüfung am 21.9.1973, das Staatsexamen am 2.12.1977 an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz ab.

Als Famulus war ich vier Wochen im Zentrallabor der Medizinischen Kliniken der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, und acht Wochen auf der internistischen Abteilung des Sankt Vincentius-Krankenhauses Speyer.

Als Medizinalassistent war ich vom 1.1.1977 - 30.6.1977 in der Rheumaklinik Wiesbaden (Direktor: Prof. Dr. K. Miehke) und vom 1.7.1977 - 31.10.1977 in einer allgemein internistischen Krankenstation sowie der Infektionsabteilung der II. Medizinischen Kliniken der Universitätskliniken Mainz (Direktor: Prof. Dr. P. Schölmerich) tätig.

Zur Zeit setze ich meine Ausbildung als Medizinal-
assistent in der Unfallchirurgischen Abteilung der
Städtischen Kliniken Wiesbaden (Direktor: PD Dr. F.
Schauwecker) bis zum 28.2.1978 fort.

